

· 基础研究 ·

20株临床来源耐药粪肠球菌的21种耐药元件基因检测与分析

丘江¹, 张洁¹, 糜祖煌²¹湖北江汉油田总医院检验科, 湖北 潜江 433121; ²无锡市克隆遗传技术研究所, 江苏 无锡 214000

[摘要] 目的: 调查20株耐药粪肠球菌株可能存在的耐药基因状况和菌株间的亲缘关系。方法: 收集2015年1月—2018年12月湖北省江汉油田总医院住院患者分离的20株耐药粪肠球菌株, 用PCR法检测1种青霉素耐药基因、4种氨基糖苷类耐药基因、6种大环内酯类耐药基因、1种链阳菌素耐药基因、2种四环素耐药基因、3种万古霉素耐药基因、2种季胺类消毒剂耐药基因、1种可移动遗传元件标志基因, 最后对检测结果作样本聚类分析(UPGMA法)。结果: 20株耐药粪肠球菌分别检出1~7种耐药元件基因, 包括1种青霉素耐药基因、3种氨基糖苷类耐药基因、2种大环内酯类耐药基因、1种四环素耐药基因、2种万古霉素耐药基因、1种可移动遗传元件标志基因。菌株亲缘关系分析可见20株耐药粪肠球菌可分为A、B 2群。B群又可分为B-1、B-2亚群。B-1亚群有2个克隆播散(4号株-14号株-17号株、8号株与11号株), B-2亚群有1个克隆播散(9号株与12号株)。结论: 青霉素耐药基因、氨基糖苷类耐药基因、大环内酯类耐药基因、四环素耐药基因、万古霉素耐药基因和可移动遗传元件是导致本组粪肠球菌耐药的重要原因。

[关键词] 粪肠球菌; 耐药; 万古霉素; 接合型转座酶; 样本聚类分析

[中图分类号] R378.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)04-528-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20200412

Detection and analysis of 21 drug resistance element genes of 20 drug resistant *Enterococcus faecalis* from clinical sources

QIU Jiang¹, ZHANG Jie¹, MI Zuhuang²¹Department of Clinical Laboratory, Hubei Jiangnan Oilfield General Hospital, Qianjiang 433124; ²Wuxi Clone Gene-tech Institute, Wuxi 214026, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the distribution of resistant determinants in drug-resistant *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), and their relationships among strains. **Methods:** Twenty strains of *E. faecalis* were collected from Jiangnan Oil Field General Hospital in Hubei from January 2015 to December 2018. Then, 1 kind of resistance gene to penicillin, 4 kinds of resistance genes to aminoglycosides, 6 kinds of resistance genes to macrolides, 1 kind of resistance gene to streptogramin, 2 kinds of resistance genes to tetracycline, 3 kinds of resistance genes to vancomycin, 2 kinds of resistance genes to quaternary ammonium disinfectants, 2 kinds of genetic markers of mobile genetic elements were analyzed by PCR. At last, sample cluster analysis was performed (UPGMA method). **Results:** At least 1 resistant determinants, and 7 at the most, were positive in 20 strains of drug-resistant *E. faecalis*. And 1 kind of resistance gene to penicillin, 3 kinds of resistance genes to aminoglycosides, 1 kind of resistance genes to macrolides, 1 kind of resistance genes to tetracycline, 2 kinds of resistance genes to vancomycin, 1 kind of genetic markers of mobile genetic elements were positive. The analysis of phylogenetic relationship showed that 20 strains could be divided into A and B two groups. The B group can be divided into 2 subgroups: B-1 and B-2. There were 2 clones in the subgroup B-1 (strain No. 4 -14 -17, and strain No. 8 -11). As well as a clone in the subgroup B-2 (strain No. 9-12). **Conclusion:** Resistance gene to penicillin, aminoglycosides, macrolides, tetracycline, vancomycin, and genetic markers of mobile genetic elements play a key role in resistance to antimicrobial agents.

[Key words] *Enterococcus faecalis*; resistance; vancomycin; conjugative transposase; sample cluster analysis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04): 528-532]

粪肠球菌常寄居于人和动物的肠道。粪肠球菌为条件致病菌,主要引起医院感染,若为血行感染可危及患者生命。尽管国内医院肠球菌的分离率远低于肠杆菌,但肠球菌对临床常用抗菌药物的耐药性并不低^[1-3]。由于国内医院耐碳青霉烯类药物的肠杆菌传播迅猛,所以自然成为国内学者关注和研究的重点。而粪肠球菌的耐药基因检测研究多年来一直较少,已有的文献报道也仅仅涉及2~12种抗菌药物的耐药基因检测(且以万古霉素耐药基因检测为主)^[4-10],并没有涉及季胺类消毒剂耐药基因和可移动遗传元件标志基因,也没有基于功能基因的菌株亲缘关系分析报道。为此,我们收集了20株耐药粪肠球菌进行了青霉素耐药基因(*bla*)、氨基糖苷类耐药基因(*aacA-aphD*、*aphA3*、*aacD*、*aacE*)、大环内酯类耐药基因(*ermA*、*ermB*、*ermC*、*mphC*、*mefA*、*msrA*)、链阳菌素耐药基因(*vatC/D*)、四环素耐药基因(*tetM*、*tetK*)、万古霉素耐药基因(*vanA*、*vanB*、*vanC*)、季胺类消毒剂耐药基因(*qacA/B*、*qacEΔ1*)、可移动遗传元件标志基因(*int Tn916*、*int I1*)等21种耐药元件基因检测,并基于这些基因检测结果进行了样本聚类分析进而了解该组菌株的亲缘关系,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

20株耐药粪肠球菌分离自2015年1月—2018年12月湖北省江汉油田总医院住院患者,其中痰标本12例,尿液标本8例。菌种鉴定采用自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司VITEK-2 Compact型)。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验

采用琼脂稀释法测定7种抗菌药物敏感性。按全国临床检验标准委员会(NCCLS)制订的标准测定各抗菌药物的最抑菌浓度(MIC),所有药敏试验结果依据美国临床和实验室标准协会(CLSI)2018版M100-S28文件对结果进行判断。

1.2.2 耐药元件基因检测

采用非离子去污剂(裂解液A)裂解与蛋白酶K(裂解液B)消化法制备细菌DNA,裂解液A与B液由无锡市克隆遗传技术研究所提供,挑取单个菌落按试剂盒说明书操作。

采用多重PCR法检测耐药粪肠球菌21种耐药元件基因。21种耐药元件基因检测引物序列均由

无锡新吴区新克隆数据分析工作室提供,引物序列和目的产物长度见表1。PCR法扩增检测试剂盒由无锡市克隆遗传技术研究所提供,按说明书配制多重PCR反应体系,25 μL的反应体系中各目标基因的特异性引物终浓度1 μmol/L,细菌DNA模版2 μL。PCR反应条件:25 ℃ 10 min(UNG酶处理),95 ℃ 2 min(UNG酶灭活)后;98 ℃ 10 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s扩增40个循环。PCR产物采用1.5%琼脂糖凝胶,电泳30 min后染色读取结果。

1.2.3 DNA序列分析

PCR扩增产物委托上海铂尚生物技术公司进行测序,测得序列自行用Chromas软件作BLASTN比对。

1.2.4 基于耐药元件基因的菌株亲缘性分析

对21种耐药元件基因(功能基因)PCR检测结果以非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)法进行样本聚类分析(无锡新吴区新克隆数据分析工作室)。

2 结果

2.1 药敏试验

20株耐药粪肠球菌至少耐1种抗菌药物,7种抗菌药物药敏试验结果显示,对青霉素耐药率最高,达100.0%,对万古霉素耐药率最低,为25.0%,其他抗菌药物的耐药率详见表2。

2.2 耐药基因检测

20株耐药粪肠球菌至少检出1种耐药元件基因,21种耐药元件基因检测阳性率见表3。

2.3 基于耐药元件基因的菌株亲缘性分析

对21种耐药元件基因(功能基因)PCR检测结果进行UPGMA法样本聚类分析。由图1可见20株耐药粪肠球菌可分为A、B 2群。B群又可分为B-1、B-2亚群。B-1亚群有2个克隆播散(4号株-14号株-17号株、8号株与11号株),B-2亚群有1个克隆播散(9号株与12号株)。20株耐药粪肠球菌耐药元件基因携带状况为最少检出1种,最多检出7种。20株耐药粪肠球菌根据样本聚类分析得出的各克隆成员及耐药元件基因携带状况见表4。

3 讨论

大量国内外研究显示,临床分离肠球菌产生β-内酰胺酶、青霉素结合蛋白(PBP)的结合位点突变为其主要耐药机制。当某些菌株产生少量的β-内酰胺酶不足以灭活抗生素时,药敏试验对青霉素敏

表1 20株耐药粪肠球菌21种耐药元件基因PCR引物序列和目的产物长度

Table 1 Primer sequences and product length of PCR for 21 kinds of resistant determinants in 20 drug-resistant *Enterococcus faecalis*

靶基因	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
青霉素耐药基因		
<i>bla</i>	P1:AGGAAGAGTATGATTCAACA;P2:CTCGTCGTTTGGTATGGC	535
氨基糖苷类耐药基因		
<i>aacA-aphD</i>	P1:CCAAGAGCAATAAGGGCATA;P2:CACTATCATAACCCTACCG	220
<i>aphA3</i>	P1:GCCGATGTGGATTGCGAAAA;P2:GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	292
<i>aadD</i>	P1:GCAAGGACCGACAACATTTTC;P2:TGGCACAGATGGTCATAACC	165
<i>aadE</i>	P1:ACTGGCTTAATCAATTTGGG;P2:GCCTTTCGCCACCTCACCG	597
大环内酯类耐药基因		
<i>ermA</i>	P1:AGCGGTAAACCCCTCTGAG;P2:TAGTGACATTTGCATGCTTCAA	457
<i>ermB</i>	P1:GAAAAGGTACTAAACCAAATA;P2:AGTAACGGTACTTAAATTTGTTTAC	616
<i>ermC</i>	P1:ACTTGTGATCAGGATAATTTCCA;P2:TCTACTTAATCTGATAAGTGAGCTATTCAC	321
<i>mphC</i>	P1:AACACATTAGCTGAAACACTCG;P2:GGGTTGCTTCAGTCCAGTCT	299
<i>mefA</i>	P1:ACTATCATTAATCACTAGTGG;P2:TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG	346
<i>msrA</i>	P1:TCCAATCATTGCACAAAATCT;P2:AATTCCTCTATTTGGTGTA	163
链阳菌素耐药基因		
<i>vatC/D</i>	P1:GACTATACCTGACGCAAATGC;P2:CAAATCAGTCAGTTCAGGAGT	330
四环素耐药基因		
<i>tetM</i>	P1:GTGTGACGAACCTTACCGAA;P2:GCTTTGTATCTCCAAGAACAC	501
<i>tetK</i>	P1:TGTAGCGACAATAGGTAATAGT;P2:AGTAGTGACAATAAACCTCCTA	363
万古霉素耐药基因		
<i>vanA</i>	P1:GCTATTCAGCTGTACTC;P2:CAGCGGCCATCATACGG	783
<i>vanB</i>	P1:CATCGCCGTCCCGAATTTCAA;P2:GATGCGGAAGATACCGTGGCT	297
<i>vanC</i>	P1:GGTATCAAGGAAACCTC;P2:CTTCCGCCATCATAGCT	822
季胺类消毒剂耐药基因		
<i>qacA/B</i>	P1:CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT;P2:CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG	417
<i>qacEΔ1</i>	P1:TAGCGAGGGCTTTACTAAGC;P2:ATTCAGAATGCCGAACACCG	300
可移动遗传元件标志基因		
<i>intTn916</i>	P1:CATCATACGCTAAAGAATGGG;P2:GGCTTCTTCAACCATAGGAA	452
<i>int I1</i>	P1:CCGAGGATGCGAACCACTTC;P2:CCGCCACTGCGCGTTACCA	373

表2 20株耐药粪肠球菌7种抗菌药物药敏试验结果

Table 2 Result of drug sensitivity test of 20 drug-resistant *Enterococcus faecalis* to 7 antimicrobial agents

抗菌药物	[n(%)]		
	耐药株数	中介株数	敏感株数
青霉素	20(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
庆大霉素(高浓度)	15(75.0)	0(0.0)	5(25.0)
链霉素(高浓度)	8(40.0)	0(0.0)	12(60.0)
红霉素	15(75.0)	0(0.0)	5(25.0)
四环素	11(55.0)	0(0.0)	9(45.0)
万古霉素	5(25.0)	0(0.0)	15(75.0)
环丙沙星	10(50.0)	0(0.0)	10(50.0)

表3 20株耐药粪肠球菌21种耐药元件基因检测阳性率

Table 3 Positive rates of 21 resistance determinants in 20 drug-resistant *Enterococcus faecalis*

靶基因	阳性株数	阳性率(%)
<i>bla</i>	5	25.0
<i>aacA-aphD</i>	15	75.0
<i>aphA3</i>	12	60.0
<i>aadE</i>	8	40.0
<i>ermB</i>	15	75.0
<i>tetM</i>	11	55.0
<i>vanA</i>	1	5.0
<i>vanB</i>	4	20.0
<i>intTn916</i>	9	45.0

未列出检测结果为阴性的基因。

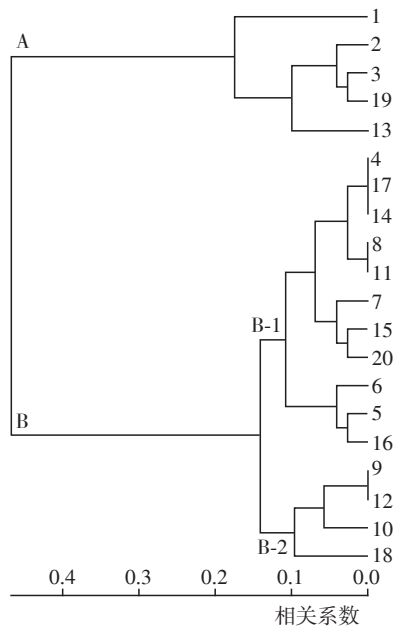


图1 20株耐药粪肠球菌21种耐药元件基因检测结果的样本聚类分析(图中数字为菌株号)

Figure 1 Sample cluster analysis of 21 resistance determinants in 20 drug-resistant *Enterococcus faecalis*

感;若菌株产生大量的酶足以灭活抗生素,细菌对青霉素表现为耐药。

PBP是位于细菌细胞膜上的蛋白质,具有酶活性,参与细菌细胞壁肽聚糖的合成,同时也是β-内酰胺类抗生素的作用靶位。不同菌种之间,PBP的数

量、大小、含量以及与抗生素的亲合力都不相同,引发肠球菌耐药的PBP是低亲和力PBP,其中引起粪肠球菌和屎肠球菌耐药的低亲和力PBP分别为PBP4和PBP5。有研究显示,PBP5基因突变使PBP5蛋白结构改变是屎肠球菌对青霉素类药物耐药的主要原因,而粪肠球菌无论对氨苄青霉素(AMP)敏感或耐药,均发现其PBP4基因有突变,提示此突变与粪肠球菌对青霉素类药物的耐药性没有必然联系,说明粪肠球菌对青霉素类药物耐药主要是由β-内酰胺酶介导。但本实验中,耐药元件基因检测显示:青霉素耐药基因 *bla* 检出率为25.0%,*bla* 基因表达青霉素酶,进而水解青霉素导致菌株对青霉素耐药,本文20株对青霉素耐药率达100.0%,因此可推断粪肠球菌还存在其他耐药机制。考虑本实验中的粪肠球菌株可能与屎肠球菌类似,包膜上存在其他PBP的突变,使青霉素结合力降低,进而耐药,这一点值得关注。

氨基糖苷类耐药基因检出 *aacA-aphD*、*aphA3*、*aadE* 等3种。*aacA-aphD* 基因表达庆大霉素修饰酶灭活庆大霉素,*aacA-aphD* 基因检出率为75.0%,与庆大霉素耐药表型一致。*aadE* 基因表达链霉素修饰酶灭活链霉素,*aadE* 基因检出率为40.0%,与链霉素耐药表型一致。大环内酯类耐药基因检出 *ermB*、*ermB* 基因表达大环内酯类作用靶位的甲基化酶。

表4 20株耐药粪肠球菌根据样本聚类分析得出的各克隆成员及耐药元件基因携带状况

Table 4 All clone members and their distribution of resistant determinants in 20 drug-resistant *Enterococcus faecalis* by sample cluster analysis

克隆成员(菌株号)	株数	占比(%)	耐药元件基因
1	1	5.0	<i>bla</i> 、 <i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i> 、 <i>aadE</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>vanA</i> 、 <i>intTn916</i>
2	1	5.0	<i>bla</i> 、 <i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i> 、 <i>aadE</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>vanB</i>
3	1	5.0	<i>bla</i> 、 <i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>vanB</i>
19	1	5.0	<i>bla</i> 、 <i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i> 、 <i>vanB</i>
13	1	5.0	<i>bla</i> 、 <i>aacA-aphD</i> 、 <i>vanB</i>
4,14,17	3	15.0	<i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>tetM</i> 、 <i>intTn916</i>
8,11	2	10.0	<i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i> 、 <i>aadE</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>tetM</i> 、 <i>intTn916</i>
7	1	5.0	<i>aacA-aphD</i> 、 <i>aadE</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>tetM</i>
15	1	5.0	<i>aphA3</i> 、 <i>aadE</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>tetM</i>
20	1	5.0	<i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i> 、 <i>aadE</i> 、 <i>ermB</i> 、 <i>tetM</i>
6	1	5.0	<i>tetM</i> 、 <i>intTn916</i>
5	1	5.0	<i>ermB</i> 、 <i>tetM</i> 、 <i>intTn916</i>
16	1	5.0	<i>ermB</i> 、 <i>tetM</i>
9,12	2	10.0	<i>aacA-aphD</i> 、 <i>ermB</i>
10	1	5.0	<i>aacA-aphD</i> 、 <i>aphA3</i>
18	1	5.0	<i>aadE</i>
合计	20	100.0	—

*ermB*基因检出率为75.0%,与大环内酯类耐药表型一致。本文菌株红霉素酯酶(*mphC*)和红霉素外排泵基因(*mefA*、*msrA*)没有检出。链阳菌素耐药基因*vatC/D*没有检出。四环素耐药基因检出*tetM*,*tetM*表达四环素作用靶位保护蛋白,该蛋白可阻碍四环素与靶位结合致菌株耐药,*tetM*基因检出率为55.0%,与四环素耐药表型一致。万古霉素耐药基因检出*vanA*、*vanB*,检出率分别为5.0%和20.0%,二者合计为25.0%,与万古霉素耐药率一致。季胺类消毒剂耐药基因(*qacA/B*、*qacEΔ1*)没有检出。可移动遗传元件标志基因检出接合型转座酶基因*intTn916*,阳性率为45.0%。本文在国内首次对粪肠球菌的耐药元件基因进行全景式的检出报告。检出率高的耐药元件基因为*aacA-aphD*、*aphA3*、*aadE*、*ermB*、*tetM*。Woods等^[13]对1株多耐药粪肠球菌的基因组测序亦发现这些基因。本文在国内首次对粪肠球菌进行接合型转座酶基因*intTn916*检测,接合型转座子Tn916是肠球菌的重要可移动遗传元件^[14]。

粪肠球菌对抗菌药物耐药性不低,国外甚至发现了耐利奈唑胺的菌株^[15-16]。因此,我国临床医院应该加强对肠球菌医院感染的监控,以防止肠杆菌医院感染大规模的暴发。

[参考文献]

- [1] 冯军花,赵建宏,时东彦,等. 2015年河北省耐药监测网肠球菌属细菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28(1):1-4
- [2] 杨青,俞云松,林洁,等. 2005—2014年CHINET肠球菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(2):146-152
- [3] 易爱玲,李金奎,段瑞华,等. 肠球菌在各类感染标本中分布及其耐药情况分析[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(19):1763-1765,1768
- [4] 林东昉,陈春辉,周迎,等. 肠球菌万古霉素高水平耐药基因*vanA*、*vanB*、*vanD*和*vanM*快速分型检测[J]. 中华传染病杂志,2017,35(2):99-104
- [5] 谢晓,王小军,李好朝. 肝胆外科患者感染肠球菌耐药基因与毒力基因检测[J]. 中国病原生物学杂志,2015,10(6):546-550
- [6] 贾伟,赵梅,王文,等. 肠球菌属耐药性与耐药基因的比较研究[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(24):5551-5554
- [7] 王立朋,何云燕,严立,等. 万古霉素耐药肠球菌耐药基因检测及分子流行病学调查[J]. 临床检验杂志,2014,32(2):136-139,143
- [8] 杨靖娴,刘静,邵冬华,等. 耐万古霉素肠球菌的耐药与毒力基因检测[J]. 实用医学杂志,2014,30(1):132-136
- [9] 张姝,莫非,黄志卓,等. 肠球菌属耐药基因检测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(3):457-460
- [10] 黄支密,石晓霞,糜祖煌,等. 肠球菌抗生素耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(1):1-5
- [11] 李萌,王惠云,匡玉莲. 肠球菌对临床11种抗生素耐药性调查分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2001,21(1):75-75
- [12] 黄新次. 1 643份病原菌分布与耐药性分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(10):1465-1468
- [13] WOODS S E, LIEBERMAN M T, LEBRETON F A, et al. Characterization of multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* isolated from cephalic recording chambers in research macaques (*macaca* spp.) [J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0169293
- [14] STARIKOVA I, AL-HARONI M, WERNER G, et al. Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* [J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(12):2755-2765
- [15] DIAZ L, KIRATISIN P, MENDES R E, et al. Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(7):3917-3922
- [16] GAWRYSZEWSKA I, ZABICKA D, HRYNIEWICZ W, et al. Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: species, clonality and determinants of linezolid resistance [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(7):1279-1286

[收稿日期] 2019-06-24